



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 04.12.79 (21) 2846902/30-15

сприведениям заявки № -

(23) Приоритет -

Опубликовано 07.01.83 Бюллетень № 1

Дата опубликования описания 07.01.83

(11) 986411

(51) М. Кл.³

A 61 D 7/02

(53) УДК 66.099.4:
591.463.1
(088.8)

(72) Авторы
изобретения

В.А. Наук и В.Г. Делеу

(71) Заявитель

Институт зоологии и физиологии АН Молдавской ССР

(54) СПОСОБ КОНСЕРВИРОВАНИЯ СПЕРМЫ ЖИВОТНЫХ

1

Изобретение относится к области искусственного осеменения сельскохозяйственных животных, в частности к способам консервирования спермы путем замораживания.

Известен способ консервирования спермы животных в пайетах, включающий разбавление спермы до половины конечной стадии разбавления защитной средой, содержащей 3% глицерина, охлаждение разбавленного семени до +4°C за 45-60 мин, вторичное разбавление семени защитной средой, содержащей 11% глицерина, расфасовку в соломинки, эквilibрацию и, наконец, замораживание его с последующим оттаиванием [1].

Недостатком этого способа является быстрое охлаждение семени до +4°C, отрицательное влияние высокой концентрации глицерина и длительного времени контакта с ним живчиков, которое проявляется в нарушении апикального края акросомы, разрушении устойчивости белково-липидных комплексов, а после замораживания и оттаивания семени быков-производителей снижается подвижность живчиков и абсолютный показатель их живучести.

2

Кроме того, при длительном контакте живчиков с глицерином имеет место утачка ряда ферментов, аминокислот, жирных кислот и функциональных групп из клеток сперматозоидов в плазму, что ведет к снижению биологической полноценности спермы.

Известен также способ консервирования спермы животных, включающий ее разбавление на первом этапе безглицериновой защитной средой, а на втором этапе - защитной средой с глицерином. При этом охлаждение проводят в течение 2 ч от 30 до 40°C, а замораживание проводят при -80°C [2].

Однако длительный контакт (более 30 мин) живчиков с глицерином приводит к нарушению устойчивости белково-липидных комплексов, морфологическим изменениям акросомы, выходу в плазму из живчиков ферментов.

В результате этого значительно снижается активность живчиков после оттаивания и составляет примерно 2-2.5 балла.

Целью изобретения является повышение жизнеспособности и биологической полноценности сперматозоидов после замораживания и оттаивания.

Цель достигается тем, что охлаждение спермы проводят от +30 до +15°C со скоростью 0,4-0,5°C/мин; от +15 до +10°C со скоростью 0,3-0,4°C/мин и от +10 до +4°C со скоростью 0,2-0,3°C/мин, эквивалентную с глицерином проводят при +4-+5°C, течение 25-30 мин, а замораживание спермы проводят в парах жидкого азота при температуре -120--140°C в течение 8-8,5 мин.

После второго разбавления семенами лактозо-фруктозо-магниевое-желточноей средой, содержащей дополнительно глицерин, проводят расфасовку семенами вручную или автоматически в полимеры соломинки объемом 0,5 мл, выдерживают их в витрине холодильника в течение 30 мин, после чего семя сразу замораживают.

Замораживание проводят в широкогорлом сосуде Дьюара, для чего соломинки раскладывают горизонтально на специальной рампе и помещают ее над парами жидкого азота на уровне 3-4 см от уровня азота при следующих температурах (см. табл. 2).

Время замораживания составляет 8 мин.

Температуру замораживания семенами контролируют термпарой и регулируют расстоянием от уровня жидкого азота до рампы, горизонтально были расположены соломинки с семенем.

Время выдержки семенами в парах жидкого азота составляет 8 мин, после чего соломинки опускают в жидкий азот, где их карантируют в течение 30 дней, а затем переводят в спермобанк для дальнейшей отправки в хозяйства.

В результате контакта семенами с глицерином в течение 30 мин улучшаются биохимические и физиологические показатели живчиков, в частности такие, как подвижность живчиков и продолжительность их жизни после оттаивания (см. табл. 3).

При предложенном режиме охлаждения достигается стабилизация морфологических, биохимических и физиологических показателей семенами (см. табл. 4).

Данные показатели характеризуют семя до его замораживания.

В табл. 5 приведены качественные показатели семенами быков-производителей после оттаивания.

Предложенный способ позволяет улучшить качество оттаянной спермы, повысить оплодотворяемость животных, при снижении количества доз семенами.

Пример. Технология приготовления и консервирования семенами сельскохозяйственных животных заключается в следующем. Вначале готовят защитную среду для разбавления семенами.

Для приготовления используют лактозу, фруктозу, рафинозу, сульфат магния, куриный желток и спермосан-3.

Разбавление семенами вышеуказанной средой проводят на половину конечной степени разбавления: температура среды в момент разбавления +30°C.

Баночки с разбавленной спермой помещают в ванночки с водой, температура которой +30°C, и переносят в холодильную витрину с постоянной температурой +4°C.

Охлаждение семенами проводят трехступенчато: от +30 до +15°C, от +15 до +10°C и от +10 до +4°C. Охлаждение проводят путем добавления кусочков тающего льда или воды комнатной температуры.

При проведении опыта взято несколько режимов охлаждения и изучено их влияние на биохимические и физиологические показатели живчиков после замораживания и оттаивания семенами (см табл. 1).

Установлено, что оптимальным режимом охлаждения является режим 3.

После охлаждения и выдержки семенами при +4°C в течение 3,0-3,5 ч сперму разбавляют вторично той же защитной средой, но содержащей дополнительно 10 мл глицерина на 100 мл дистиллированной воды.

Температура среды в момент дополнительного разбавления равна +4°C.

at the moment of glycerol addition

Режимы охлаждения семенами

Таблица 1

Температурный и временной режимы	Режимы охлаждения семенами, °C/мин			
	1	2	3	4
от +30 до +15°C	0,2	0,3	0,4	0,5
от +15 до +10°C	0,2	0,2	0,3	0,4
от +10 до +4°C	0,1	0,1	0,2	0,3
Время охлаждения семенами до +4°C, мин (min)	160 min	135 min	85 min	63 min

cooling time

freezing in vapors of LN

first observation eggs rock

fructose

cooling

before glycerol adding glycerol 10% (v/v) to the cooled sperm

cooling rate 4°C

holding 30 min

freezing step in vapors of LN freezing time 8 min

storing in liquid nitrogen

fertilization

85 195

Т а б л и ц а 2
Влияние различных режимов замораживания семени быков-производителей
на подвижность и продолжительность жизни живчиков после оттаивания

Опыт, №	Температура заморажива- ния, °C <i>freezing t°C</i>	Показатель		
		подвижность живчиков по- сле оттаива- ния, баллы	продолжительность жизни живчиков по- сле оттаивания при 37°C, дни	абсолютный пока- затель живучести живчиков при +2—+4°C (S_a)
1	-120	4,6±0,21	8,8±0,2*	592,8±25,9*
2	-130	4,6±0,18	8,8±0,2*	593±24,5*
3	-140	4,6±0,21	9,0±0,3*	590±26,9
4	-160	4,2±0,35	7,6±0,5	446,4±17,1

*—различия статистически достоверны по отношению к прототипу.

*motility
of sperm*

Глицир
А/1000000

* - различия статистически достоверны по отношению к промышленности

Т а б л и ц а 4

Морфологические, биохимические и физиологические показатели
семени до замораживания

Показатель	Предложенный способ охлаждения семени	Патент Великобритании № 1479648
Устойчивость белково-хлестеринных комплексов, мкг холестерина на 10 ⁵ живчиков	221±6,7 ^a	203±5,8
Устойчивость белково-липидных комплексов, мкг фосфолипидов	2195±17,2 ^a	2022±15,2
% живчиков с нормальной акросомой	75±1,5 ^a	69,0±1,3
Активность глутамино-аспаргиновой трансминазы в плазме семени	161±2,5	184±2,8 ^a
Подвижность живчиков	8,0±0,08 ^a	7,5±0,06

XX—P < 0,01;
X—P < 0,05.

Т а б л и ц а 5

Результаты испытания предложенного способа низкотемпературного замораживания с применением ЛФРМЖ среды

Опыт, №	Показатель	Предлагаемый способ
1	Подвижность живчиков после оттаивания	4,75±0,09
2	Продолжительность жизни живчиков после оттаивания при 37°C, ч	8,8±0,34
3	Абсолютный показатель живучести живчиков после оттаивания при 37°C	30,2±1,2
4	Продолжительность жизни живчиков после оттаивания при +2—+4°C,	212,0±7,3
5	Абсолютный показатель живучести живчиков после оттаивания при +2—+4°C	602,6±15,4
6	Состояние акросомы живчиков: нормальной разрушенной	61,5±1,2 38,5±1,2
7	Устойчивость белково-холестеринных комплексов, мкг холестерина на 10 живчиков	185
8	Оплодотворяемость коров от первого осеменения	67,5

фертилизатор

Формула изобретения

Способ консервирования спермы животных, включающий ее разбавление безглицериновой защитной средой, охлаждение, повторное разбавление спер-

мы защитной средой, содержащий глицерин, эквilibрацию с глицерином и замораживание, отличающийся тем, что, с целью повышения жизнеспособности и биологической полноценности сперматозоидов после замораживания

и оттаивания, охлаждение спермы проводят от +30 до +15°C со скоростью 0,4-0,5°C/мин, от +15 до +10°C со скоростью 0,3-0,4°C/мин и от +10 до +4°C со скоростью 0,2-0,3°C/мин, эквilibрацию с глицерином проводят при +4-+5°C в течение 25-30 мин, а замораживание спермы проводят в па-

рах жидкого азота при температуре -120--140°C в течение 8-8,5 мин.

Источники информации,

приняты во внимание при экспертизе

1. In French straw technique, 1976.

2. Патент Великобритании № 1479648, кл. А 01 N 1/202, 1977 (прототип).

Редактор О. Юркова Составитель А. Филиппова Корректор И. Ватрушкина
 Техред С. Мигунова
 Заказ 10363/6 Тираж 711 Подписное
 ВНИИПИ Государственного комитета СССР
 по делам изобретений и открытий
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5
 Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4

PTO 03-4914

CY=SU DATE=19830107 KIND=A
PN=986,411

SU 986411

ANIMAL SPERM PRESERVATION METHOD
[SPOSOB KONSERVIROVANIYA SPERMY ZHIVOTNYKH]

V.A. Nauk, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. AUGUST 2003

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(10):	SU
DOCUMENT NUMBER	(11):	986,411
DOCUMENT KIND	(12):	Russian author's certificate
PUBLICATION DATE	(43):	19830107
PUBLICATION DATE	(45):	
APPLICATION NUMBER	(21):	2846902/30-15
APPLICATION DATE	(22):	19791204
ADDITION TO	(61):	
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51):	A 61 D 7/02
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):	
PRIORITY COUNTRY	(33):	
PRIORITY NUMBER	(31):	
PRIORITY DATE	(32):	
PRIORITY COUNTRY	(33):	
PRIORITY NUMBER	(31):	
PRIORITY DATE	(32):	
PRIORITY DATE	(32):	
DESIGNATED CONTRACTING STATES	(84):	
INVENTORS	(72):	V.A. Nauk, V. G. Deley
APPLICANT	(71):	Institut zoologii I fiziologii AN Moldavskoy SSR
TITLE	(54):	Animal sperm preservation method
FOREIGN TITLE	(54A):	Sposob konservirovaniya spermy zhivotnykh

The invention pertains to the field of artificial insemination of agricultural animals, to methods of sperm preservation by the freezing method in particular.

A method of preserving the sperm of animals in a small storage cases, which includes dilution of the sperm to half the final stage of thinning with a protective medium, which contains 3% glycerin, cooling of the diluted semen to $+4^{\circ}\text{C}$ in 45-60 minutes, secondary dilution of the semen in a protective medium, which contains 11% glycerin, packaging in straw, equilibration and, finally, its freezing with subsequent thawing [1].

A shortcoming of this method is the rapid cooling of the semen to $+4^{\circ}\text{C}$, the negative influence of the high concentration of glycerin and long contact time of the spermatozoa with it, which is manifested in damage to the apical edge of the acrosome, disturbance to stability of the lipid-protein complexes, and after freezing and thawing of the semen of the producer bulls mobility of the spermatozoa declines along with the absolute index of their survivability.

Moreover, during prolonged contact of the spermatozoa with the glycerin the leakage of a number of enzymes, amino acids, fatty acids and functional groups of cells of the spermatozooids into the plasma

*Number in the margin indicates pagination in the foreign text.

occurs, which leads to a reduction of the biological vitality of the sperm.

A method of preserving animal sperm is also known that includes its dilution in the first stage of a non-glycerin protective medium, and in the second stage of a protective medium with glycerin. In this case the cooling is carried out for two hours from 30 to 40°C, and the freezing is conducted at -80°C [2].

However, the prolonged contact (more than 30 minutes) of the spermatozoa with the glycerin leads to disturbance of the protein-lipid complex stability, morphological change of the acrosome, escape of enzymes into the plasma from the spermatozoa.

As a result of this action the activity of the spermatozoa after thawing is considerably lowered and reaches a level of approximately 2-2.5.

The aim of the invention is to increase the survival rate and biological vitality of the spermatozooids after freezing and thawing. /2

The goal is achieved due to the fact that the cooling of the sperm is carried out from +30 to +15°C at a rate of 0.4-0.5°C/minute, from +15 to +10°C at a rate of 0.3-0.4°C/minute and from +10° to +4°C at a rate of 0.2-0.3°C/minute, equilibration with glycerin is carried out at +4-+5°C for 25-30 minutes, and the freezing of the sperm is carried out in vapors of liquid nitrogen at temperature of -120-140°C for 8-8.5 minutes.

Example. The technology of the preparation and preservation of the semen of agricultural animals consists of the following. One first prepares a protective medium for diluting the semen. For the preparation one uses lactose, fructose, raffinose, magnesium sulfate, chicken egg yolk and Spermosan-3.

The dilution of semen with the aforementioned medium is conducted to half the final degree of dilution: the medium temperature at the time of dilution is $+30^{\circ}\text{C}$.

Beakers with the diluted sperm are placed in a bath with water, whose temperature is $+30^{\circ}\text{C}$, and they are transferred to a refrigerated case with constant temperature of $+4^{\circ}\text{C}$.

Cooling of the semen is conducted in three stages: from $+30$ to $+15^{\circ}\text{C}$, from $+15$ to $+10^{\circ}\text{C}$ and from $+10$ to $+4^{\circ}\text{C}$. The cooling is carried out by adding pieces of melting ice or water at room temperature.

While conducting the experiment we employed several cooling modes and studied their effect on the biochemical and physiological indicators of the spermatozoa after freezing and thawing of the semen (see Table 1).

It was found that the optimal cooling mode is mode 3.

After cooling and holding the semen at $+4^{\circ}\text{C}$ for 3.0-3.5 hours ✓ the sperm was diluted a second time with the same protective medium, but one that contains additionally 10 ml of glycerin per 100 ml of distilled water.

The medium temperature at the time of the additional dilution was +4°C.

After the second dilution of the semen with the lactose-fructose-magnesium-egg yolk medium, which contains in addition glycerin, we carried out packaging of the semen manually or automatically in polymer straws with volume of 0.5 ml, held them in the glass case of the refrigerator for 30 minutes, after which the semen was immediately frozen.

The freezing is carried out in a wide-mouth Dewar flask, for which the straw is laid out horizontally on a special ramp and it is placed over vapors of liquid nitrogen at a level of 3-4 cm from the nitrogen level at the following temperatures (see Table 2).

The freezing time is eight minutes.

The semen freezing temperature is monitored with a thermocouple and regulated by the distance from the level of the liquid nitrogen to the ramp, where straw with the semen is placed horizontally.

The semen holding time in the liquid nitrogen vapors is eight minutes, after which the pieces straw are lowered into the liquid nitrogen, where they are kept for 30 days, and then they are transferred to a sperm bank for subsequent shipment to farms.

As a result of the semen contact with the glycerin for 30 minutes the biochemical and physiological indicators of the spermatozoa are improved, in particular the mobility of the spermatozoa and their life duration after thawing (see Table 3).

With the proposed cooling conditions one can achieve stabilization of the morphological, biochemical and physiological indicators of the semen (see Table 4).

The given indicators characterize the semen before its freezing.

Table 5 presents the quality indicators of the semen of the producer bulls after thawing.

The proposed method allows one to improve the quality of the thawed sperm, to increase the fertility of the animals with a reduction of the amount of sperm doses.

Table 1 Semen cooling conditions

Temperature and time Conditions	Semen cooling conditions, °C/min			
	1	2	3	4
From +30 to +15°C	0.2	0.3	0.4	0.5
From +15 to +10°C	0.2	0.2	0.3	0.4
From +10 to +4°C	0.1	0.1	0.2	0.3
The cooling time of semen To +4°C, minutes	160	135	85	63

Table 2

Influence of different conditions of producer bull semen freezing on mobility and vital duration of spermatozoa after thawing

/3

Experiment No.	Freezing temperature, °C	Indicator	Indicator	Indicator
		Mobility of spermatozoa after thawing, grade	Life duration of spermatozoa after thawing at 37°C, days	Absolute index of spermatozoa survival rate at +2-+4°C (s _a)
1	-120	4.6±0.21	8.8±0.2*	592.8±25.9*
2	-130	4.6±0.18	8.8±0.2*	593±24.5*
3	-140	4.6±0.21	9.0±0.3*	590±26.9
4	-160	4.2±0.35	7.6±0.5	446±17.1

- - Differences are statistically reliable with respect to the prototype.

Table 3

/4

Время выдержки разбавленного семена средой, содержащей гли- церин, мин (a)	Подвижность живчиков после оттаивания в зависимости от режимов охлаждения (b)				Продолжительность жизни живчиков после оттаивания в зависимости (c) от режимов охлаждения				Устойчивость белково-холесте- риновых комплексов зависимости от ремени выдержки, мкг холестерина на 10 ⁹ живчиков (d)
	2	3	4	контроль (e)	2	3	4	конт- роль (e)	
1 ^I	4,3±0,3	4,3±0,1	4,2±0,09	4,25±0,1	7,4±0,2	7,7±0,2	7,0±0,3	7,0±0,2	166±6,8 146±7,2
5 ^I	4,2±0,1	4,25±0,07	4,0±0,08	-	7,0±0,3	7,3±0,3	7,0±0,25	-	148±7,8
10 ^I	4,25±0,12	4,25±0,1	4,15±0,2	-	7,0±0,2	7,3±0,3	6,9±0,25	-	150±8,1
15 ^I	4,2±0,15	4,25±0,2	4,2±0,1	-	7,2±0,2	7,3±0,2	7,2 18	-	155±7,7
20 ^I	4,25±0,12	4,35±0,1	4,3±0,08	-	7,5±0,25	7,5±0,2	7,3±0,3	-	167±8,3
25 ^I	4,3±0,15	4,5±0,12	4,35±0,14	-	7,4±0,3	7,8±0,2*	7,4±0,2	-	174±3,4*
30 ^I	4,4±0,12	4,6±0,1*	4,35±0,12	-	7,6±0,2	7,8±0,2*	7,4±0,3	-	178±6,2*
35 ^I	4,2±0,1	4,3±0,14	4,25±0,12	-	7,3±0,3	7,5±0,3	7,4±0,3	-	171±7,4
40 ^I	4,1±0,15	4,25±0,1	4,15±0,08	-	7,1±0,2	7,4±0,3	7,2±0,2	-	162±6,5

*Differences are statistically reliable with respect to the prototype.

Table 3

Influence of semen holding time after additional dilution of semen in a synthetic medium, which contains glycerin, on the biochemical and physical indicators of the spermatozoa.

Key:

(a) Holding time Of diluted semen In a medium that Contains glycerin, Minutes;

(b) Mobility of spermatozoa after thawing depending on cooling conditions;

(c) Life duration of spermatozoa after thawing depending on cooling conditions;

(d) Stability of protein- cholesterol complexes depending on Holding time, Mcg of Cholesterol Per 10^9 Spermatozoa;

(e) Control

Table 4

Morphological, biochemical and physiological indices of semen prior to thawing.

/5

Indicator	Proposed method of semen cooling	British patent number 1,479,648
Resistance of protein-cholesterol complexes, mcg of cholesterol per 10^9 spermatozoa	221±6.7*	203±5.8
Resistance of protein-phospholipid complexes, mcg % phospholipids	2195±17.2*	2022±15.2
% spermatozoa with normal acrosome	75±1.5*	9.0±1.3
Activity of the glutamine-asparagin transaminase in the semen plasma	161±2.5	184±2.8**
Mobility of spermatozoa	8.0±0.08*	7.5±0.06

XX - $P < 0.01$;

X - $P < 0.05$.

Table 5
Morphological, biochemical and physiological indices of semen prior to thawing.

Experiment, Number	Indicator	Proposed method
1	Mobility of spermatozoa after thawing	4.75±0.09
2	Life duration of spermatozoa after thawing at 37°C, hours	8.8±0.34
3	Absolute index of spermatozoa survival rate after thawing at 37°C	30.2±1.2
4	Life duration of spermatozoa after thawing at +2-+4°C	212.0±7.3
5	Absolute index of spermatozoa survival rate after thawing at +2-+4°C	602.6±15.4
6	Condition of spermatozoa acrosome: Normal Destroyed	61.5±1.2 38.5±1.2
7	Stability of the protein-cholesterol complexes, mcg of cholesterol for 10 spermatozoa	185
8	Fertility of cows from first insemination	67.5

CLAIMS

The method of animal sperm preservation, which includes its dilution with a non-glycerin protective medium, cooling, repeated dilution of the sperm by a protective medium, which contains glycerin, equilibration with glycerin and freezing, characterized by the fact that in order to improve the vital functioning and biological value of the spermatozoids after freezing and thawing, the cooling of the sperm is carried out from +30 to +15°C at a rate of 0.4-0.5°C/minute, from +15 to +10°C at a rate of 0.3-0.4°C/minute, and from +10 to +4°C at a rate of 0.2-0.3°C/minute, equilibration

with glycerin is carried out at $+4$ - $+5^{\circ}\text{C}$ for 25-30 minutes, and the sperm freezing is carried out in vapors of liquid nitrogen at temperature of -120 - 140°C for 8-8.5 minutes.

Information sources considered by the examining board:

1. The French Straw technique, 1976.
2. British patent number 1,479,648, Intl. Class A 01 N 1/202, 1977 (prototype).

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.